

**TUMORELLENES HATÁSÚ NÖVÉNYI KIVONATOK ÉS
AZOK ÖSSZETEVŐINEK VIZSGÁLATA SEJTVONALAKON**

PhD tézis összefoglaló

Réthy Borbála

Szeged

2007

TUMORELLENES HATÁSÚ NÖVÉNYI KIVONATOK ÉS AZOK ÖSSZETEVŐINEK VIZSGÁLATA SEJTVONALAKON

PhD tézis összefoglaló

Réthy Borbála

Témavezető:
Prof. Falkay György

Szeged
2007

BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések az egyik leggyakrabban előforduló betegségcsoport, világszerte vezetnek a mortalitási statisztikákat. A betegség tipikusan multifaktoriális, hátterében többek között a programozott sejthalál, az apoptózis csökkent működése játszik szerepet. Kezelését nehezíti a sejtek gyógyszerekkel szembeni rezisztenciájának gyakori kifejlődése. A tumoros sejtekre a kontroll nélküli szaporodás és dedifferenciálódás jellemző.

A sejtek élő szervezeten belüli egyensúlyának kialakításában az apoptózisnak fontos szabályozó szerepe van. A folyamat morfológiai valamint biokémiai markerekkel jellemezhető. A morfológiai jelek közül a sejtmag kondenzáció, sejtsugorodás, sejtmembrán strukturális integritásának változása valamint az apoptotikus testek kialakulása a legjellemzőbb. Biokémiai markerek közül megemlítendő a DNS feldarabolódás valamint intracelluláris fehérjék hasadása. Ezen folyamat fontos regulációs faktorai a kaspázok valamint a Bcl-2 család.

A daganatos betegségek gyógyításának egyik legnagyobb gátja a kezelés során kialakuló multidrog rezisztencia (MDR). A jelenség hátterében a daganatos sejtek citosztatikumokkal szemben kialakuló érzéketlensége áll, amit a sejteken megjelenő ATP-dependens transzportfehérjék nagyfokú expressziója okoz. Egyik legrészletesebben vizsgált pumpa a P-glikoprotein (Pgp), amelyet Juliano és Ling ismert fel 1976-ban kínai hörcsög petefészek sejtekben.

Ennek megfelelően az elmúlt években számos daganatellenes szert vezettek be, melyek apoptózist indukálnak és/vagy a MDR-t csökkentik. Ma a klinikai vizsgálatokban részt vevő hatóanyagok közel 60%-a természetes vagy természetes eredetű vegyület. A növényi kivonatokat, mint különféle komponenseket tartalmazó természetes könyvtárakat, a tumorelles szerek fejlesztésének egyik ígéretes forrásaként tartják számon.

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben összefoglaltak alapján a következő kísérleti célokat határoztuk meg:

- a Magyarországon előforduló Asteraceae család kiválasztott fajaiából preparált extraktumok citosztatikus hatásának szisztematikus szűrővizsgálata.
- a *Tamus communis* L. citosztatikus hatásáért felelős tiszta anyagok izolálása és azonosítása.
- a *Ruta graveolens* L.-ből korábban izolált akridonvázak alkaloidok daganatellenes hatásának jellemzése. Első lépésként a vegyületek apoptózis indukáló hatását kívántuk bizonyítani.
- kísérleteink további részében ez utóbbi vegyületcsoport Pgp funkciójára kifejtett gátlásának, valamint a doxorubicinnel való kombináció antiproliferatív hatásának vizsgálata állt.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi nyersanyag

Az Asteraceae fajokat, amelyek Magyarországon főleg vadon fordulnak elő, virágzási idejük alatt gyűjtöttük. A növényekből 4-féle kivonatot készítettünk *n*-hexánnal (A kivonat), kloroformmal (B kivonat) és vízzel (C kivonat). A visszamaradt növényi mintát forrásban levő vízfürdőn extraháltuk és fagyaszttva szárítottuk (D kivonat).

A *T. communis* L. gyökértörzsét a Mecsekben gyűjtöttük. A citosztatikus hatásért felelős hatékony anyagokat biológiai hatásvizsgálattal kísért izolálás során kinyertük, majd azonosítottuk.

Az akridon alkaloidokat korábban izolálták a *R. graveolens* L.-ből (arborinin (1), evoxantin (2), isogravakridon-klorin (3), rutakridon (4), gravakridondiol (5), gravakridontriol (6), gravakridondiol-monometil-éter (7), gravakridontriol-monoglükozid (8), gravakridondiol-monoglükozid (9) (1. ábra)).

Sejtenyésztés

Humán (MCF7, Hela és A431 – emlő, méhnyak és bőrkarcinóma) valamint egér (L5178 – egér T-sejtes limfóma, érzékeny valamint pHa MDR1/A retrovírussal transzfektált rezisztens) daganatos sejtvonalat használtunk kísérleteinkben. Tenyésztésre a humán sejtek esetében minimális esszenciális médiumot, az egérlimfóma sejtek esetében McCoy's 5A médiumot használtunk, az MDR1 gén expresszióját kolhicin jelenléte biztosította. A médium minden esetben tartalmazott főtális állati szérumot, antibiotikum keveréket, valamint nem esszenciális aminosavat. A sejteket telített páratartalmú, 37 °C-os, 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban tartottuk.

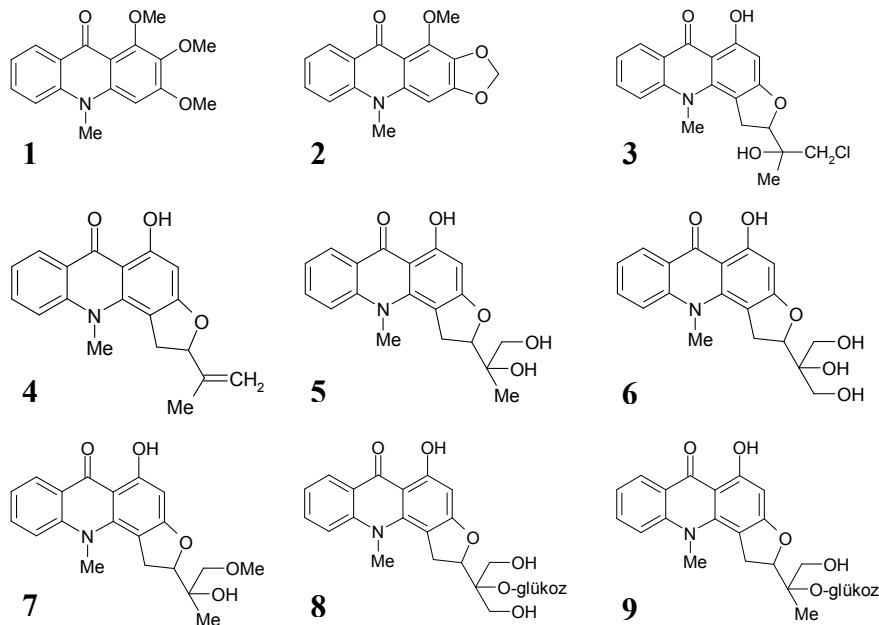
MTT teszt

Az antiproliferatív hatás mérésére az *in vitro* MTT tesztet használtuk [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]). A redukált MTT abszorbanciáját 545 nm-en spektrofotométerrel mértük, a kezeletlen sejtek abszorbanciáját vettük 0%-nak. Dimetil-szulfoxiddal (DMSO) készítettük a törzsoldatokat (10 mg/ml kivonatokra, 30 mM a tiszta anyagokra) az oldószer végkoncentrációja legfeljebb 0,3% volt, amely előzetes kísérleteink alapján a proliferációt nem zavarja. Azt a kivonatot, mely 10 µg/ml-ben kiemelkedő aktivitást mutatott (50% feletti proliferáció gátlás), tovább vizsgáltuk, citosztatikus hatásra jellemző dózis-hatás görbét vettünk fel, valamint meghatároztuk a direkt toxicitást. A citosztatikus és citotoxikus hatás különválasztására eltérő sejtszámot és expozíciós időtartamot használtunk (72 h, 5000 sejt/üreg ill. 24 h, 25000 sejt/üreg).

A tesztelt akridonok és doxorubicin kombinációs vizsgálatait az ún. checkerboard módszerrel végeztük. A sejtnövekedési rátát MTT teszttel mértük, és az interakció mértékét a következő rendszerben fejeztük ki (FIX = frakcionált inhibítoros index):

FIX < 0.5	Szinergista hatás
FIX = 0.51-1	Additív hatás
1 < FIX < 2	Nincs jelentős interakció
FIX > 2	Antagonista hatás

1. ábra. Az akridon vázas alkaloidok szerkezete.



Permeabilitási vizsgálat

A sejtmembránon keresztüli permeabilitás meghatározására mesterséges lipidmembránt alkalmaztuk (PAMPA), amelyből $\log P_e$ értéket számoltunk. A lipid kettős membrán *n*-dodekánt tartalmazott *n*-hexánban, és az akridonok koncentrációját az akceptor lemezen 340 nm fotometriásan határoztuk meg 5 órás inkubáció után.

Floureszcens mikroszkópia

Az akridin-narancs (AO) – etídium-bromidos (EB) kettős festéssel az élő, korai valamint késői apoptotikus és nekrotikus sejteket lehet elkülöníteni. A festés során, az AO áthatol az intakt sejtmembránon, és a sejtmagot homogén zöldre festi élő sejtekben, míg korai apoptózis esetén a sejtmag granulált zöldre festődik. Az EB csak a fokozott permeabilitású sejtmembránon halad át, és a sejtmagot pirosra festi. A morfológiai paramétereket 24 órás kezelés után vizsgáltuk.

Áramlási citometria

A DNS tartalom mérését propídium-jodidos jelölés mellett HeLa sejteken végeztük. A 24 órás kezelés után a sejtciklus egyes szakaszaiban levő sejtek %-os arányát határoztuk meg (G1, S és G2/M), valamint a szubdiploid populációt, amelyet mint apoptotikus állományt azonosítottuk.

A rodamin 123 retenciós vizsgálattal a Pgp működését tanulmányozhatjuk, amelyet 30 perces inkubáció után mértünk. A rodamin 123 retenciós vizsgálatokban verapamilt alkalmaztunk pozitív kontrollként (40,6 μ M), a tesztanyagok aktivitást a kezelt valamint kezeletlen sejtek fluoreszcenciájának hányadosaként adtuk meg.

Reverz transzkriptáz-PCR

Bax, Bcl-2 és MDR1 mRNS szintű kifejeződését RT-PCR technikával határoztuk meg. Kezelés után (24 óra HeLa sejteknél, 48 óra L5178 MDR sejteknél), 10^6 sejtet denaturáló oldattal kezeltük. Teljes RNS kivonása után, 0,5 μ g RNS-t kicsaptunk, és cDNS-sé átvitük MMLV-RT segítségével. A PCR reakciót cDNS, Taq polimeráz valamint primerek jelenlétében végeztük. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) szerepelt.

EREDMÉNYEK

Szűrővizsgálat

Az antiproliferatív szűrővizsgálatban az Asteraceae család egyes fajait vontuk be részben népgyógyászati alkalmazásuk, részben véletlenszerű kiválasztás alapján. Négy nemzetségből 25 fajt választottunk ki [Astereae (6), Inuleae (3), Heliantheae (5) és Anthemideae (11)], melyeknek kiválasztott növényi részeiből 228 kivonatot készítettünk. Az első szűrés 10 μ g/ml koncentrációban 3 humán daganatos sejtvonalon történt, melyből 25 kivonat mutatott 50% feletti antiproliferatív hatást valamely sejtvonalon. A továbbiakban ezekre a kivonatokra IC_{50} értéket állapítottunk meg, valamint elkülönítettük a direkt citotoxicitást és citosztatikus hatást 30 μ g/ml koncentrációban.

A kivonatok között főleg a kloroformban (B kivonat) oldódó lipofil komponenseket találtuk aktívnak (72%-a a kiválasztott kivonatoknak). Néhány esetben az *n*-hexános és vizes metanolos kivonat (A és C kivonat) is aktívnak bizonyult. A D jelzésű kivonat egy esetben sem mutatott 50% feletti aktivitást.

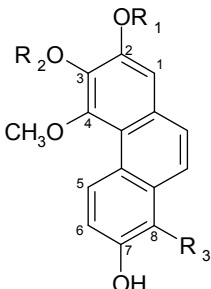
Az Anthemideae fajok között a talaj feletti részből készült kivonatok voltak hatásosak. Az *A. collina*-ból készült kivonat az osztódó sejtekre mutatott szelektivitást, melyet jelentős citosztatikus-citotoxikus különbség jelez. Az Astereae fajok esetében a gyökérből készült kivonatok hatásosabbak, mint az egyéb szervekből készültek. Ebben a csoportban az *E. canadensis* *n*-hexános kivonata mutatkozott a leghatékonyabbnak. Jelentős citosztatikus hatást mértünk a Heliantheae nemzetség *A. artemisiifolia*, *H. annuus* és *X. italicum* fajaiban, ezen eredmények magyarázzák a korábban leírt népgyógyászati alkalmazásukat. Szűrővizsgálatunk legaktívabb kivonatai a *H. annuus* valamint a *X. italicum* kloroformos kivonatai, melyek mindhárom sejtvonalon 5 µg/ml alatti IC₅₀ értékkel rendelkeznek. Az Inuleae fajokat illetően mérsékelt aktivitást találtunk az *I. ensifolia*, kifejezettet a *T. speciosa* esetében.

Biológiai hatásvizsgálattal kísért citosztatikus vegyületek izolálása a *T. communis*-ből

A népgyógyászati megfigyelések alapján daganatnövekedést gátló *T. communis*-ből biológiai hatásvizsgálattal kísért izolálás során nyertük ki az aktív komponenseket. Az első frakcionálásnál a kloroformos kivonat potensebbnek bizonyult, mint a metanolos. A továbbiakban a kloroformos fázist 13 frakcióra bontottuk, ahol a IV, V+VI, VIII, IX és XIII frakció mutatott 50% feletti daganatnövekedést gátló hatást 10 µg/ml koncentrációban. További kromatográfiás lépésekben 5 fenantrén vázas vegyületet izoláltunk.

A IV. frakcióból a 7-hidroxi-2,3,4-trimethoxifenantrént (**10**) és 2,7-dihidroxi-3,4,8-trimethoxifenantrént (**12**) izoláltuk. A 2,7-dihidroxi-3,4-dimethoxifenantrént (**11**) az V-VI. frakcióból, 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimethoxifenantrén (**13**) és 3,7-dihidroxi-2,4-dimethoxifenantrént (**14**) a VIII-IX. frakcióból nyertük ki (**1. táblázat**). A **10**-es anyag új természetes anyag, míg a **11** (nudol), **12** (konfusarin) és **13** anyag először lett a *T. communis*-ből kimutatva. A **14**-es anyagot korábban kimutatták a növény gyöktörzséből, és TaVIII-ként ismeretes.

1. táblázat. A *T. communis*-ből izolált vegyületek képletei és citosztatikus IC₅₀ értékei HeLa sejtvonalon.

		10	11	12	13	14
	R₁	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-CH ₃
	R₂	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H
	R₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
	IC₅₀ (µM)	13,85	20,18	0,97	>30	6,66

Akridon alkaloidok dagaellenes hatása

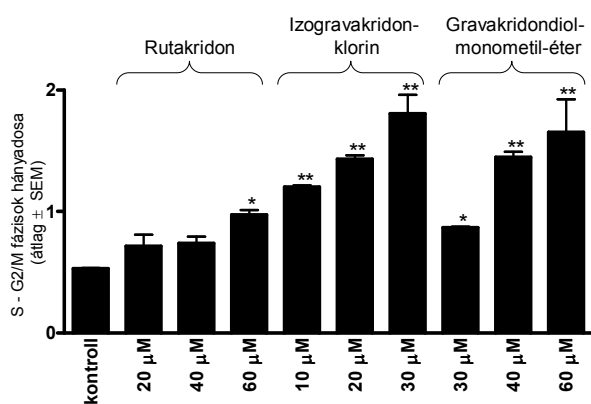
Az akridonok antiproliferatív valamint permeabilitásra utaló értékei a **2. táblázatban** láthatóak. Az **1** anyag kiemelkedő citosztatikus hatással rendelkezik, különösen HeLa sejteken. A furakridonok (**3-9**) citosztatikus aktivitásában csak kisebb különbséget találtunk, a **3**, **4**, **5** és **7** anyag aktivitása minden esetben jobb volt, mint a **6** és **8+9** anyag. A permeabilitást PAMPA teszttel mértük és log P_e értéket számoltunk. Az IC₅₀ valamint a log P_e értékek közötti korreláció 0,717; 0,856 és 0,578 HeLa, MCF-7 és A431 sejtvonalra.

2. táblázat. Az akridon alkaloidok citosztatikus IC₅₀ valamint permeabilitásra jellemző log P_e értékei.

Tesztanyag	IC ₅₀ érték (μM)			log P _e érték
	HeLa	MCF7	A431	
1	1,84	11,74	12,95	-
2	inaktív*	inaktív*	inaktív*	-
3	8,35	4,53	3,02	-5,108
4	5,27	7,69	14,41	-4,994
5	7,87	19,91	14,83	-5,087
6	23,24	99,60	27,88	-5,865
7	3,84	13,20	11,97	-5,361
8+9	inaktív*	inaktív*	inaktív*	-6,359
Doxorubicin	0,15	0,28	0,15	-
Ciszplatin	12,43	9,63	2,84	-

*: 30 μM koncentrációban nem fejtett ki jelentős (min. 50%) citosztatikus hatást.

Az antiproliferatív hatás mellett a sejtciklusra kifejtett hatást a DNS tartalom meghatározásával mértük. A további vizsgálatokat 3 kiválasztott akridon vázas vegyületen végeztük. A sejtciklus vizsgálatok alapján a **3, 4 és 7** anyag 24 órás kezelés után HeLa sejteken megemelte az S fázisban levő sejtek arányát, míg a G2/M fázisban lévőkét csökkentette a kontrollhoz képest. A sejtciklus változásokat az S és G2/M fázisok hányadosával adtuk meg (**2. ábra**).

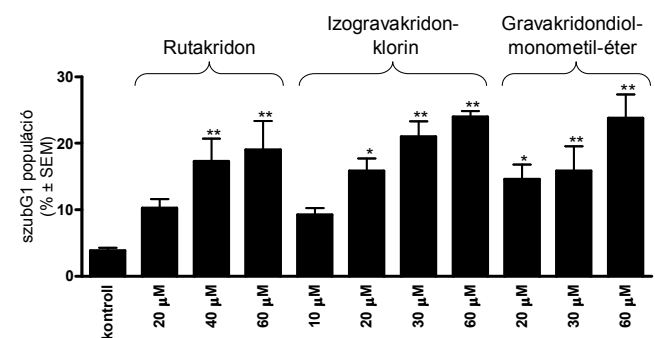


2. ábra. Sejtciklus analízis: a kiválasztott akridon alkaloidok hatása HeLa sejtekre 24 órás kezelés után. *: p<0,05 és **: p<0,01, a kontrollhoz viszonyítva.

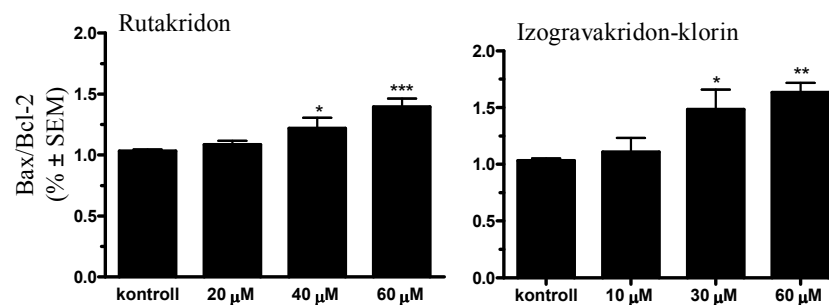
Apoptózis indukció

Sejtsugorodás, sejtmembrán permeabilitás növekedés, sejtmag granuláció, mint tipikus morfológiai paramétereket tapasztalhattunk 24 órás **3, 4 és 7** anyag kezelése után HeLa sejtonalon AO/EB kettős festés mellett.

Biokémiai markerek közül a DNS fragmentációt detektáltuk DNS tartalom áramlásos citometriás mérése során. A sejtciklus G1 fázisa előtt felszaporodó szubG1 populáció, mint apoptotikus állomány növekedését tapasztaltuk, mely az apoptózis során kialakuló DNS degradáció eredménye. Kontroll esetben 5% alatti, míg **3, 4 és 7** anyag kezelés hatására koncentráció függően emelkedett a szubG1 állomány (**3. ábra**).



3. ábra. DNS fragmentációs teszt: HeLa sejteken 24 órás akridon kezelés által kiváltott az apoptózis. *: p<0,05 és **: p<0,01, a kontrollhoz viszonyítva.



4. ábra. Rutakridon és izogravakridon klorin hatása a Bax/Bcl-2 mRNS expresszióra HeLa sejteken 24 órás kezelés után. *: p<0,05, **: p<0,01 és ***: p<0,001, a kontrollhoz viszonyítva.

MDR gátlás

A Pgp okozta efflux gátlásának meghatározására a rodamin 123 akkumulációs tesztet alkalmaztuk L5178 MDR egér limfóma sejtvonalon. 40 μM koncentrációjú **3**, **4**, **5** és **6** anyag hatékonyabban gátolta a Pgp működését, mint a pozitív kontrollként használt 40,6 mM verapamil. Az akridonok közül az **5**-ös anyag bizonyult a legpotensebbnek (**3. táblázat**).

Az akridonok antiproliferatív hatásának meghatározása után, a Pgp-t expresszáló L5178 sejteken meghatároztuk az akridonok és doxorubicin kombináció citosztatikus választ checkerboard módszer segítségével. A **6** és **7** anyag valamint doxorubicin között szinergista interakciót tapasztaltunk. E két anyag esetében 48 órás kezelés után MDR1 gén mRNS szintű csökkenését tapasztaltuk.

3. táblázat. Akridon alkaloidok hatása a Rh-123 akkumulációs tesztben L5178 MDR sejtvonalon.

anyag	IC ₅₀ (μM)	Interakció doxorubicinnel
1	69,57	addíció
2	33,22	addíció
3	0,062	antagonizmus
4	16,02	antagonizmus
5	33,97	addíció
6	67,21	szinergizmus
7	43,65	szinergizmus

DISZKUSSZIÓ

A daganatos betegségek gyógyítása, valamint újabb daganatellenes szerek kifejlesztése világszerte a klinikum és a gyógyszerfejlesztés egyik legfontosabb területe. Munkám során természetes eredetű testanyagok között kerestem potenciális anyagokat, amelyek a tumorellenes kutatások egyik kiinduló vegyületei lehetnek. A magyarországi Asteraceae család fajainak 4 különféle kivonatának szűrővizsgálata ígéretes növények kiválasztását eredményezte. A saját eredményeinket, valamint a népgyógyászati

felhasználást figyelembe véve *E. canadensis*, *E. annuus*, *A. artemisiifolia*, *H. annuus* és *X. italicum* további vizsgálatok célnövényei lehetnek.

A *T. communis* gyöktörzséből biológiai hatásvizsgálattal kísért izolálás során 5 fenantrén vázas vegyületet nyertünk ki. A **10-12** valamint **14** anyag kiemelkedő antiproliferatív hatást mutatott HeLa sejtvonalon, a **10** anyag új természetes vegyület, míg **11-13** anyag korábban más növényben már kimutatott vegyületek.

A *R. graveolens*-ből izolált akridon vázas vegyületek antiproliferatív hatásának részletesebb vizsgálata során kimutattuk, hogy a **3** és **7** anyag megemelte az S fázisban levő sejtek arányát, míg a G2/M fázisban lévőket csökkentette. Feltételezett hatásuk a sejtciklus S és G2 fázis közötti átmenet gátlása.

Az akridonok programozott sejthalált okoznak, melyet morfológiai és biokémiai markerek kimutatásával bizonyítottunk. Morfológiai eltéréseket mikroszkópos technikával, míg a biokémiai jelzőket áramlások citométer segítségével DNS tartalom és apoptotikus faktorok mRNS szintű meghatározásával mutattunk ki.

A Pgp-okozta rezisztencia gátlására irányuló vizsgálatokat Pgp-t expresszáló egérlimfóma sejtvonalon végeztük. Az akridonok gátolták a Pgp funkcióját, a **6** és **7** anyag szinergista módon viselkedett doxorubicin mellett, valamint csökkentette a MDR1 gén mRNS szintű expresszióját.

Az akridonok apoptózist indukáló és MDR gátló hatása a gyógyszerkutatás szempontjából két értékes tulajdonság. Akár mint testanyagok, vagy mint kiinduló molekulák szerepelhetnek új daganatellenes szerek kifejlesztésénél.

FÜGGELÉK

Értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Réthy B**, Kovács A, Zupkó I, Forgo P, Vasas A, Falkay G, Hohmann J. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. *Planta Med* 2006;72:767-70.
IF₂₀₀₆: 1,746
- II. **Réthy B**, Zupkó I, Minorics R, Hohmann J, Ocsóvszki I, Falkay G. Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*. *Planta Med* 2007;73:41-8.
IF₂₀₀₆: 1,746
- III. **Réthy B**, Csupor-Löffler B, Zupkó I, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, Rédei T, Falkay G. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytother Res* (közlésre elfogadva)
IF₂₀₀₆: 1,144

Egyéb közlemények:

- IV. Kovács A, Forgo P, Zupkó I, **Réthy B**, Falkay G, Szabó P, Hohmann J. Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 2007;68:687-91.
IF₂₀₀₆: 2,417
- V. Csomós P, Zupkó I, **Réthy B**, Fodor L, Falkay G, Bernáth G. Isobassinin and its analogues: Novel types of antiproliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:6273-76.
IF₂₀₀₆: 2,538

Egyéb kivonatok:

1. **Réthy B**, Zupkó I, Falkay G. A patkány anyai agy noradrenerg és dopaminerg transzmissziójának vizsgálata szuperfúziós technikával. Ph.D. Tudományos Napok 2004. 2004 április 8-9, Budapest.
2. Forgo P, Hohmann J, Dombi G, Zupkó I, **Réthy B**, Falkay G. Isolation, structure determination and cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. Second International Symposium on Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas. 15-18 August, 2004, São Pedro, Brazil.
3. **Réthy B**. Természetes és felszintetikus akridon-szrmazékok citotoxikus hatásának vizsgálata. VII. Clauder Ottó Emlékverseny. 2004. október 14-15, Visegrád.
4. **Réthy B**, Zupkó I, Hohmann J, Falkay G. A *Ruta graveolens*ből izolált citotoxikus anyagok vizsgálata in vitro. A Magyar Tudomány Ünnepe Szegeden. 2004. november 2-19, Szeged.
5. **Réthy B**, Kovács A, Zupkó I, Hohmann J, Falkay G. A *Tamus communis*-ből izolált fenantrének citotoxikus hatásának vizsgálata in vitro. Ph D Tudományos Napok 2005. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola. 2005. április 14-15, Budapest.
6. **Réthy B**, Zupkó I, Hohmann J, Falkay G. Investigation of cytotoxic activity of naturally occurring acridone alkaloids. Joint Meeting on Medicinal Chemistry. 20-23 June, 2005, Vienna, Austria.
7. Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Hohmann J, **Réthy B**, Zupkó I, Falkay G, Máthé I. In vitro cytotoxicity of extracts from Hungarian Asteraceae. 53rd Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant Research. 21–25 August, 2005, Florence, Italy.
8. Vasas A, Rédei D, Kovács A, Forgó P, Zupkó I, **Réthy B**, Falkay G, Hohmann J. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis* L. 53rd Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant Research. 21–25 August, 2005, Florence, Italy
9. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, **Réthy B**, Zupkó I, Forgó P, Hohmann J. A cickafarkfü citotoxikus anyagainak vizsgálata. XI. Magyar Gyógynövény Konferencia. 2005. október 13-15, Dobogókő.
10. Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Hohmann J, **Réthy B**, Zupkó I, Falkay G, and Máthé I. Az Asteraceae család Magyarországon előforduló fajainak in vitro citotoxicitási vizsgálata. XI. Magyar Gyógynövény Konferencia. 2005. október 13-15, Dobogókő.
11. Kovács A, Vasas A, Rédei D, Forgó P, Zupkó I, **Réthy B**, Falkay Gy, Szabó LGy, Hohmann J. A pirítógyökér (*Tamus communis* L.) citotoxikus hatású anyagai. XI. Magyar Gyógynövény Konferencia. 2005. október 13-15, Dobogókő.

12. **Réthy B**, Zupkó I, Molnár J, Falkay G. Akridon-vázas alkaloidok tumorellenes hatásának vizsgálata *in vitro*. Ph. D. Tudományos Nap. Szegedi Tudományegyetem, MTA Szegedi Akadémiai Bizottság. 2006. május 3, Szeged.
13. Kovács A, Vasas A, **Réthy B**, Zupkó I, Forgó P, Hohmann J. Citotoxikus fenantrének izolálása a *Tamus communis* L.-ből. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. 2006. május 25-27, Budapest.
14. **Réthy B**, Hohmann J, Ocsosvski I, Molnár J, Zupkó I, Falkay G. Akridon-alkaloidok multidrog rezisztencia módosító és apoptózist indukáló hatásának vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. 2006. május 25-27, Budapest.
15. Zupkó I, **Réthy B**, Csupor-Löffler B, Hohmann J, Hajdú Z, Ocsosvski I, Falkay G. Magyarországi növényfajok citotoxikus hatású anyagainak vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. 2006. május 25-27, Budapest.
16. **Réthy B**, Hohmann J, Ocsosvski I, Molnár J, Zupkó I, Falkay G. Apoptosis induction by acridone alkaloids and effect on reversal of multidrug resistance. 15th World Congress of Pharmacology. 2-7 July, 2006, Beijing, China.
17. **Réthy B**. Növényi eredetű anyagok tumorellenes hatásának vizsgálata. Magyar Tudomány Ünnepe Szegeden. 2006 november 9, Szeged.
18. Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Hohmann J, **Réthy B**, Zupkó I, Falkay G, Máthé I. Magyarországon előforduló Asteraceae fajok *in vitro* antiproliferatív hatásának vizsgálata. Anniversary Scientific Session. 23-24 April, 2007, Targu-Mures, Romania.
19. **Réthy B**, Minorics R. A *Ruta graveolens*-ből izolált akridonok tumorellenes hatásának vizsgálata. VIII. Clauder Ottó Emlékverseny. 2007. április 12-13, Budapest.
20. Kovács A, Vasas A, Zupkó I, **Réthy B**, Forgó P, Hohmann J. Antitumor activity of xanthanolides from *Xanthium italicum* Moretti. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. 2-6 September, 2007, Graz, Austria.
21. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, **Réthy B**, Zupkó I, Falkay G, Forgó P, Hohmann J. Activity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Achillae collina*. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. 2-6 September, 2007, Graz, Austria.